

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenl gungsschrift**
⑩ **DE 195 49 118 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
A 01 N 1/00
A 61 K 31/195
G 01 N 1/28

②① Aktenzeichen: 195 49 118.1
②② Anmeldetag: 29. 12. 95
④③ Offenlegungstag: 10. 7. 97

Ⓟ zu spät

DE 195 49 118 A 1

⑦① Anmelder:
Stief, Thomas W., Dr., 35415 Pohlheim, DE

⑦④ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑥ Entgegenhaltungen:

DE	35 05 555 A1
US	54 39 888 A
US	54 16 093 A
EP	06 72 665 A1
EP	06 71 390 A2
EP	06 23 595 A1
EP	01 92 135 A2
EP	01 85 390 A2
WO	95 23 809 A1
WO	95 23 608 A1
WO	94 08 941 A1
WO	93 18 060 A1
WO	93 11 759 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Hämostaseaktivierungs-Inhibitor und Verfahren zum Hemmen der Hämostaseaktivierung in Blut oder anderen biologischen Flüssigkeiten

⑤⑦ Die Erfindung betrifft die Verwendung einer mindestens eine Guanidinogruppe der Formel $\text{-NH-C(NH}_2\text{)=NH}$ oder eines Derivats davon enthaltenden Verbindung als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor. Aufgrund der Wirkung des Hämostaseaktivierungs-Inhibitors als Antikoagulans, Antifibrinolytikum, Antiinflammans und/oder kompetitiver Serinproteaseninhibitor wird das Hämostasesystem unterbrochen. Insbesondere eignen sich zu diesem Zweck die Verbindungen Guanidinocarbonsäure (wie Guanidinoessigsäure oder Arginin) und Guanidin. Die Erfindung beschreibt weiterhin ein Verfahren zum Hemmen der Hämostaseaktivierung im Blut oder anderen Flüssigkeiten, wobei eine als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor verwendete Verbindung in Mengen zu Blut oder Plasma zugegeben wird, daß Konzentrationen im Bereich von 1 bis 200 mMol/l erhalten werden. Die als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können zum Behandeln von Hämostasestörungen eingesetzt werden.

DE 195 49 118 A 1

Beschr ibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Guanidinogruppen-enthaltenden Verbindung oder eines Derivats davon als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor, ein Verfahren zum Hemmen der Hämostaseaktivierung im Blut oder anderen biologischen Flüssigkeiten sowie die Verwendung einer Guanidinogruppenenthaltenden Verbindung zum Behandeln pathologischer Hämostaseaktivierung, wie Verbrauchskoagulopathie.

Die Hämostase ist das System, welches die Fließbarkeit des Blutes reguliert. Sie ist gekoppelt mit Immunantwort und Entzündung. Störungen der Hämostase gehen einher mit Fehlregulationen des enzymatischen Gerinnungs- und/oder Fibrinolyse-Systems. Diese Störungen sind oft lebensbedrohlich.

Bei der Gewinnung und Vorbereitung von Blutproben für die Diagnose, im besonderen für die Diagnose von Gerinnungsstörungen und Hämostaseaktivierung, ist zu beachten, daß es nicht in vitro zur Gerinnungsaktivität kommt, welche das Meßergebnis verfälschen würde. Wichtige diagnostische und therapeutische Entscheidungen werden auf der Basis der mit diesen Proben erzielten Ergebnisse getroffen. Die Art des verwendeten Hämostaseaktivierungs-Inhibitors, der als Antikoagulans und/oder Antifibrinolytikum wirkt, ist von äußerster Wichtigkeit, da er Einfluß auf das Analyseergebnis nimmt.

Das herkömmlich verwendete Citrat-Blut (Trinatriumcitrat in einer Konzentration von 0,11 mol/l in H₂O im Verhältnis von 1 Teil Citrat zu 9 Teilen Blut) antagonisiert nicht ausreichend die Kontaktpphase der Hämostase. Es kommt trotz Calciumkomplexierung zu geringer Prothrombin- oder Plasminogen-Aktivierung. Die entstehende Thrombin- oder Plasmin-Aktivität ist als in vitro Artefakt anzusehen und verfälscht im besonderen die Meßergebnisse der hochsensitiven Hämostaseteste (wie z. B. der Nachweis von löslichem Fibrin oder von Thrombin-Antithrombin III (TAT)- oder Plasmin-Antiplasmin (PAP)-Komplexen). Besondere Schwierigkeiten ergeben sich bei der Untersuchung von eingefrorenen Proben, da das Kontaktsystem der Hämostase bei Temperaturen zwischen 0° C und 15° C aktiviert wird.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Hämostaseaktivierungs-Inhibitor bereitzustellen, der die Diagnose und Therapie von Hämostasestörungen, wie einer pathologisch erhöhten Hämostaseaktivierung, erlaubt und die Nachteile von Citrat überwindet.

Die Aufgabe wird durch die Verwendung einer mindestens eine Guanidinogruppe der Formel $\text{—NH—C(NH}_2\text{)=NH}$ oder eines Derivats davon enthaltenden Verbindung als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor gelöst.

Als Derivate kommen Substitutionen am Stickstoffatom der Guanidinogruppe in Frage. So kann das Wasserstoffatom beispielsweise durch eine Alkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, wie eine Methylgruppe, substituiert werden.

Der Ausdruck "Hämostaseaktivierungs-Inhibitor" bedeutet, wie er hierin verwendet wird, daß das Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System an mindestens einer Stelle unterbrochen wird, d. h. keine Aktivierung oder nur eine geringfügige Aktivierung der Hämostase stattfindet. Die erfindungsgemäßen Hämostaseaktivierungs-Inhibitoren wirken anti-koagulierend, anti-fibrinolytisch und/oder als kompetitive Serinproteaseninhibitoren. Insbesondere bindet der Serin-, Histidin- oder Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum der Serinproteasen, zu denen verschiedene Hämostaseenzyme gehören, bestimmte Aminosäureseitenketten, vor allem von basischen Aminosäuren des Substratpolypeptids, und das Polypeptid wird an der entsprechenden Stelle geschnitten.

Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen ähneln den mit dem aktiven Zentrum der Serinproteasen interagierenden Gruppen und konkurrieren mit diesen um die Bindung am aktiven Zentrum, werden jedoch nicht umgesetzt.

Insbesondere kann Guanidinocarbonsäure, wie Guanidinoessigsäure, vorzugsweise mit Glycin oder Natriumhydrogencarbonat auf pH 7 bis 11, vorzugsweise 8 bis 10, gepuffert, oder Guanidin verwendet werden.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, ein Verfahren bereitzustellen, durch welches eine Hämostaseaktivierung im Blut oder anderen biologischen Flüssigkeiten verhindert werden kann.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren, in dem der vorstehend erwähnte Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in Mengen zu Blut oder Plasma zugegeben wird, daß Konzentrationen im Bereich von 1 bis 200 mmol/l, vorzugsweise 5 bis 150 mmol/l erhalten werden.

Dabei hat es sich bewährt, den Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in einer Menge vorzulegen, daß ein Mischungsverhältnis von 1 : 2 bis 1 : 20, vorzugsweise 1 : 5 bis 1 : 10, mit Blut eine Plasmakonzentration von 100 bis 136 mmol/l (bei einem Hämatokrit von 35 bis 55%) ergibt. Besonders bevorzugt ist es, 685 mmol/l Hämostaseaktivierungs-Inhibitor, wie z. B. Arginin (pH 8,5) bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 10 oder 367 mmol/l Hämostaseaktivierungs-Inhibitor bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 5 in einem Blutentnahmebehälter vorzulegen, wenn man einen Hämatokrit von 35 bis 55% berücksichtigt.

Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in Kombination mit Calciumkomplexbildnern, vorzugsweise EDTA, eingesetzt wird.

Der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor für die Behandlung von Blut oder Plasma sollte einen basischen pH-Wert, vorzugsweise im Bereich von pH 7,4 bis 9, besonders bevorzugt pH 8,5 bis 8,8, aufweisen. Beim diagnostischen Nachweisverfahren können auch noch alkalischere pH-Werte (bis zu pH 11) angewendet werden.

Das durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelte Blut oder Plasma eignet sich für die Diagnose, insbesondere für die Diagnose von Hämostasestörungen, wie pathologischer Hämostaseaktivierung.

Der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor kann auch für die Transfusion und/oder zum Behandeln von pathologischer Hämostaseaktivierung, wie die Verbrauchskoagulopathie oder die disseminierte, intravasale Gerinnung, verwendet werden, da die erfindungsgemäßen Plasmakonzentrationen beispielsweise von Arginin leicht auch therapeutisch erreicht werden können. Insbesondere wird erfindungsgemäß Arginin mit einem physiologischen pH-Wert von 7,4 verwendet.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

Beispiel 1

Antikoagulation durch Arginin oder Guanidinium

1000 µl Proben menschlichen Citrat-Blutes wurden steigenden Konzentrationen an Argininhydrochlorid oder Guanidiniumcarbonat (pH 8,5) ausgesetzt. 25 µl 1000 mmol/l CaCl₂ wurden hinzugefügt und die Gesamtblutgerinnungszeit bei Raumtemperatur bestimmt.

Ergebnis

Antikoagulanskonzentration [mmol/l Plasma]	Gerinnungszeit	
	Argininzusatz	Guanidiniumzusatz
0	4 Minuten 22 Sekunden	4 Minuten 22 Sekunden
2,5	4 Minuten 56 Sekunden	4 Minuten 59 Sekunden
25	9 Minuten 26 Sekunden	9 Minuten 47 Sekunden
50	13 Minuten 19 Sekunden	14 Minuten 08 Sekunden
100	106 Minuten 38 Sekunden	113 Minuten 42 Sekunden
150	ungerinnbar	ungerinnbar
200	ungerinnbar	ungerinnbar

Arginin- oder Guanidinium in Blut führt zu einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit. Konzentrationen über 100 mmol/l hemmen die Gerinnung vollständig.

Beispiel 2

Antikoagulation der Kontaktphase der Hämostase bei Einfrieren/Auftauen

1000 µl Proben von gepooltem normalem Citratplasma, welches steigende Konzentrationen an Arginin oder Guanidiniumcarbonat (pH 9) enthält, wurden bei -20°C eingefroren und anschließend bei 37°C im Wasserbad wiederaufgetaut. Die Proben wurden auf deren Gehalt an löslichem Fibrin getestet ([®]Coaset FM, Kabi Vitrum, Mölndal, Schweden).

Ergebnis

Antikoagulanskonzentration [mmol/l Plasma]	Lösliches Fibrin [µg/ml]	
	Argininzusatz	Guanidiniumzusatz
0	34,2	34,2
2,5	28,1	27,3
25	21,6	20,2
50	12,3	11,4
100	2,8	2,2
150	1,3	1,4
200	1,2	1,3

Einfrieren/Auftauen von herkömmlichem Plasma induziert Fibrinbildung, da das Kontaktsystem der Blutgerinnung aktiviert wird. Der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor verhindert dies in Konzentrationen > 100 mmol/l. Bereits Konzentrationen unter 50 mmol/l reduzieren die Fibrinbildung um mehr als 50%.

Beispiel 3

Diagnostik von Aktivierungsmarkern der Hämostas

Blut von n = 23 gesunden Blutspendern wurde

- a) in herkömmlichen Citratröhrchen (ein Teil 0,11 mol/l Trinatriumcitrat zu 9 Teilen Blut)
- b) in Arginin-EDTA Röhrchen (ein Teil 0,685 mol/l Arginin, pH 8,5, zu 9 Teilen Blut, 1,5 mg/ml EDTA)

aufgenommen, 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert und

1. sofort
2. nach 3 Stunden bei Raumtemperatur
3. nach Einfrieren und Wiederauftauen

auf die plasmatische Konzentration an Thrombin-Antithrombin III (TAT)-Komplexen (Behringwerke, Marburg, Deutschland), löslichem Fibrin [LF] (Kabi, Mölndal, Schweden), α 2-Makroglobulinkomplexiertes Thrombin und α 2-Makroglobulin-komplexiertes Plasmin untersucht. Dazu wurden 50 μ l Plasma, 50 μ l Thrombinstandard (0,01 NIH-Einheiten (10 mU/ml in 150 mmol Tris, 120 mmol/l Arginin, 0,1% Triton X 100[®], pH 8,0), 50 μ l Plasminstandard (0,001 CTA-Einheiten (1 mU/ml in 150 mmol Tris, 120 mmol/l Arginin, 0,1% Triton X 100[®], pH 8,0) mit 100 μ l 75 mmol/l Tris, 0,1% Triton X 100[®], 600 mmol/l KCl, 150 mmol/l Arginin, pH 8,0, enthaltend

- a) 1,5 mmol/l chromogenes Substrat für Thrombin HD—Phe—Pip—Arg—pNA
- b) 1,5 mmol/l chromogenes Substrat für Plasmin HD—Val—Leu—Lys—pNA

35 Minuten bei 45° C (Erhitzungsblock für Mikrotiterplatten, Organon, Turnhout, Belgien) inkubiert. Daraufhin wurde die spezifische Extinktionsänderung bei 405 nm (und gegebenenfalls ein Trübungsausgleich bei 490 nm) bestimmt. Als Nullwert diente die Messung nach 5 Minuten Inkubation. Standardisiert wurde durch den mitgeführten reinen Enzymwert. Alternativ dazu kann das Substrat-Reagenz in 50 μ l 2 x konzentriert und zusätzlich 50 μ l 40 mmol/l Chloramin T[®] zugesetzt oder 600 mmol/l KCl, 150 mmol/l Arginin, pH 8, beispielsweise durch 300 mmol/l eines Guanidinogruppen-tragenden Hämostaseaktivierungs-Inhibitors, pH 7 bis 11, vorzugsweise pH 8 bis 10, ersetzt werden. Vorteilhaft ist ein Reaktionsgemisch-Reagenz aus Hämostaseaktivierungs-Inhibitor und Singulett-Sauerstoff-Erzeuger.

Ergebnis

Citrat-Plasma

	TAT	LF	a2M-IIa	a2M-Pli
	[ng/ml]	[μ g/ml]	mU/ml	mU/ml
1.	4,1 \pm 2,7	2,5 \pm 1,9	3,7 \pm 2,3	13,0 \pm 4,0
2.	6,8 \pm 3,9	5,9 \pm 3,3	2,3 \pm 1,5	19,5 \pm 7,3
3.	20,5 \pm 13,1	34,2 \pm 11,4	15,5 \pm 11,0	29,0 \pm 11,6

Guanidino-Plasma

	TAT	LF	a2M-IIa	a2M-Pli
	[ng/ml]	[μ g/ml]	mU/ml	mU/ml
1.	2,1 \pm 1,1	1,5 \pm 1,0	3,1 \pm 1,5	2,6 \pm 0,6
2.	2,3 \pm 1,4	1,6 \pm 1,2	2,5 \pm 1,4	2,5 \pm 0,5
3.	2,5 \pm 1,3	1,8 \pm 1,4	2,5 \pm 1,4	2,7 \pm 0,6

Man erkennt, daß Citrat ein ungenügendes Antikoagulans und Antifibrinolytikum ist. Sowohl Gerinnung als auch Fibrinolyse können noch aktiviert werden. Bereits wenige Stunden Inkubation bei Raumtemperatur führen zu artifiziell veränderten Meßwerten.

Besonders schlecht ist die anti-hämostaseaktivierende Wirkung bei Einfrieren/Auftauen der Proben. Im Gegensatz dazu erweist sich der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor als sehr geeignet, um auch nach mehrstündiger Inkubation der Blutprobe oder nach Einfrieren/Auftauen verläßlich Werte zu erhalten.

Beispiel 4

Stabilität der Leukozyten

a) in Abhängigkeit der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor-Konzentration

1000 µl Proben von 1. EDTA-Blut und 2. Citrat-Blut wurden mit ansteigenden Konzentrationen an a) Guanidiniumcarbonat, pH 9, oder b) Argininhydrochlorid, pH 9, versehen. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Blutzellen automatisch gezählt.

Ergebnis

Antikoagulans- konzentration im Plasma [mmol/l]	EDTA-Blut	Citrat-Blut
	PMN wiederge- funden [%]	PMN wiederge- funden. [%]
0	a) 100 b) 100	a) 100 b) 100
1	a) 100 b) 100	a) 100 b) 100
5	a) 100 b) 100	a) 100 b) 100
25	a) 100 b) 100	a) 97 b) 98
50	a) 100 b) 100	a) 94 b) 95
100	a) 100 b) 100	a) 81 b) 84
150	a) 95 b) 96	a) 52 b) 56
175	a) 92 b) 94	a) 29 b) 33
200	a) 47 b) 51	a) 6 b) 8

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind stabil bei Hämostaseaktivierungs-Inhibitor-Konzentrationen bis zu etwa 150 mmol/l in EDTA-Blut und bis zu etwa 75 mmol/l in Citrat-Blut. Überraschenderweise erweist sich EDTA-Blut gegenüber dem für Gerinnungsuntersuchungen sonst üblichen Citrat-Blut als überlegen mit Hinsicht auf eine Kombination mit einem kompetitiven Hämostaseaktivierungs-Inhibitor.

b) Leukozyten-Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes

1000 µl Proben von Citrat-Blut wurden mit 100 mmol/l a) Guanidiniumcarbonat oder b) Argininhydrochlorid unterschiedlichen pH-Wertes supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Blutzellen automatisch gezählt.

Ergebnis

pH Wert	PMN [% wiedergefunden]		Thrombozyten/Lymphozyten [% wiedergefunden]	
	a)	b)	a)	b)
7.0	100	100	100	100
8.0	100	100	100	100
8.5	100	100	100	100
9.0	93	94	95	97
10.0	62	67	88	91
10.5	39	42	83	84
11.0	13	18	80	82

Thrombozyten und Lymphozyten sind relativ resistent gegenüber den hier untersuchten pH-Änderungen. Neutrophile Granulozyten sind bis zu einem pH-Wert des Hämostaseaktivierungs-Inhibitors von 8,5 stabil, pH 9 erzeugt einen etwa 7%-igen Verlust an Zellen. Die vermehrte Lyse von Granulozyten muß vermieden werden, da deren granuläre Enzyme zu einer artifiziellen Abänderung der zu messenden Hämostaseparameter führen würden. Daher sollte der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor einen pH Wert ≤ 9 haben.

Erythrozyten sind bei Konzentrationen des Hämostaseaktivierungs-Inhibitors (Antikoagulans/Antifibrinolytikums) bis zu 150 mmol/l Plasma stabil. Konzentrationen über 150 mmol/l können eine Hämolyse erzeugen.

Beispiel 5

Antifibrinolytische Wirkung von Arginin und Guanidinium

50 μ l Guanidiniumcarbonat oder Argininhydrochlorid (pH 8) ansteigender Konzentration (0-1000 mmol/l) wurden mit 50 μ l a) 5 IU Urokinase/ml, b) 1 μ g Zwei-Ketten-t-PA/ml und 100 μ g BrCN-Abbauprodukte des Fibrinogen, c) 1 μ g Zwei-Ketten-t-PA/ml ohne t-PA-Stimulator, d) 0,1 CTA-Einheiten Plasmin/ml mit 50 μ l 10 CTA-Einheiten Plasminogen/ml in Testpuffer (100 mmol/l Tris, 0,01% Triton X 100[®], pH 8,5 und 50 μ l 3 mmol HD-Val-Leu-Lys-pNA/ml 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Extinktionsänderung bei 405 nm bestimmt.

Ergebnis: Arginin und Guanidinium in Konzentrationen > 100 mmol/l inhibieren die Urokinase- oder t-PA vermittelte Fibrinolyse vollständig. 25 mmol/l Hämostaseaktivierungs-Inhibitor (Antikoagulans/Antifibrinolytikum) inhibieren die Fibrinolyse zu ca. 50%. Amidolytische Plasminaktivität wird bis zu 200 mmol/l Arginin nicht inhibiert.

Beispiel 6

Einfluß des Mischungsverhältnisses auf Erythrocytenstabilität

- a) 500 μ l EDTA-Blut wurden mit einer 50 μ l Pipette zu vorgelegten 25 μ l 1400 mmol/l Arginin, pH 8,5, gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 20).
- b) 450 μ l EDTA-Blut wurden mit einer 50 μ l Pipette zu vorgelegten 50 μ l 685 mmol/l Arginin, pH 8,5, gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 10).
- c) 400 μ l EDTA-Blut wurden mit einer 50 μ l Pipette zu vorgelegten 100 μ l 367 mmol/l Arginin, pH 8,5, gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 5).
- d) 250 μ l EDTA-Blut wurden mit einer 50 μ l Pipette zu vorgelegten 250 μ l 179 mmol/l Arginin, pH 8,5, gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 2).
- e) 250 μ l EDTA-Blut wurden mit einer 50 μ l Pipette zu vorgelegten 250 μ l 0,9% NaCl gegeben (Mischungsverhältnis 1 : 2).

Daraufhin wurde 10 Minuten bei 2000 \times g abzentrifugiert, und

- a) 74 μ l Überstand und 126 μ l 0,9% NaCl (zum Volumenausgleich)
- b) 81 μ l Überstand und 119 μ l 0,9% NaCl
- c) 100 μ l Überstand und 100 μ l 0,9% NaCl
- d) 200 μ l Überstand
- e) 200 μ l Überstand

auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 405 nm bestimmt.

Ergebnis:

- a) 0,283
- b) 0,322
- c) 0,331
- d) 0,342
- e) 0,347

Man erkennt, daß auch hochkonzentrierter Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in der Vorlage nicht zu einer verstärkten Hämolyse des Blutes führt. Eine Hämolyse würde von e) nach a) zunehmende Extinktionswerte verursachen.

Beispiel 7

Bestimmung der Kontaktaktivator-induzierten fibrinolytischen Aktivität von Plasma

50 μ l a) Arginin/EDTA-antikoagulierte Plasma und b) Citrat-Plasma von $n = 23$ normalen Blutspendern wurde mit 50 μ l 15 mmol/l Chloramin T[®] und 150 μ l Testreagenz, bestehend aus 50 μ g/ml Ellagsäure in 100 mmol/l Tris, 0,1% Triton X 100[®], pH 8,0, 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 μ l 3 mmol/l HD-Val-Leu-Lys-pNA in 2 mol/l KCl, 10 mmol/l Tranexamsäure, 300 mmol/l Arginin zugegeben, bei 45°C inkubiert und die Extinktionsänderung/15 Minuten bei 405 nm bestimmt. Als Nullwert dient eine Messung mit

Zusatz des chromogenen Substrat-Reagenzes sofort nach dem Testreagenz.

Ergebnis: Der Normalbereich der Kontaktphasen-aktivierten, fibrinolytischen Aktivität liegt bei 100% \pm 30% (Mittelwert \pm Standardabweichung) (100% = ca. 0,100 Extinktionseinheiten/15 Minuten). Die aktivierte fibrinolytische Aktivität läßt sich nur in Arginin- oder Guanidinium-antikoagulierten Proben bestimmen. Im CitratPlasma kommt es zu einer unspezifischen Aktivierung der Kontaktphase der Hämostase, Prourokinase wird vorzeitig, d. h. noch bevor das Plasma im Test eingesetzt werden kann, zu Urokinase aktiviert, und diese wird durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor inaktiviert. Daraus resultiert eine fälschlich erniedrigte, Kontaktphasen-aktivierte, fibrinolytische Aktivität.

Beispiel 8

Antikoagulierende Wirkung von Arginin

Bei 50 μ l normalem menschlichen Citrat-Plasma, welches 0 bis 140 mmol/l Arginin enthält, wurde die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) und die Thromboplastinzeit (PT) bestimmt.

Ergebnis

Plasmakonzentration Arginin [mmol/l]	APTT	PT
	[s]	[s]
0	32,5	15,7
1,1	32,8	15,8
2,2	33,1	15,9
4,4	33,7	16,2
8,8	34,5	16,4
17,5	35,4	16,6
35	39,2	17,8
70	52,6	21,3
140	131,2	31,2

Zunehmende Konzentrationen an Arginin im Plasma führen zu einer verlängerten aktivierten partiellen Thromboplastinzeit und Thromboplastinzeit.

Beispiel 9

Einfluß des pH-Wertes auf die antikoagulierende Wirkung von Arginin

50 μ l normales menschliches Plasma wurden mit 50 μ l einer a) 50 mmol/l b) 100 mmol/l Arginin-Lösung in aqua dest. unterschiedlichen pH-Wertes (Kontrolle: 50 μ l aqua dest.) und 50 μ l 25 mmol/l CaCl_2 bei 37°C in einem Kugelkoagulometer (Amelung, Lemgo, Deutschland) inkubiert und die Gerinnungszeit doppelt bestimmt.

Ergebnis

Gerinnungszeit Verhältnis (Antikoagulans/Kontrolle)

	[s]	
Kontrolle	288	1,0
Arginin		

a) 16,7 mmol/l Endkonz.

pH 7,4	390	1,4
pH 8,0	399	1,4
pH 8,5	525	1,8
pH 9,0	569	2,0

b) 33,3 mmol/l Endkonz.

PH 7,4	467	1,6
pH 8,0	604	2,1
pH 8,5	626	2,2
PH 9,0	650	2,3

Man erkennt, daß der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor mit stärker alkalisch werdendem pH das Plasma besser antikoaguliert, daß aber auch bei physiologischem pH-Wert bereits eine deutliche antikoagulierende Wirkung von Arginin vorhanden ist (Verhältnis = 1,4 bei 16,7 mmol/l Endkonzentration).

Beispiel 10

Hämostaseaktivierungs-Inhibition bei Hämostasestörung wie bei Verbrauchskoagulopathie

50 µl a) normales, gepooltes Citrat-Plasma und b) Plasma mit 5,7 Urokinase-inhibierenden Einheiten Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)/ml wurden mit 10 µg löslichem Fibrin (Kabi, Möldal, Schweden) supplementiert. Daraufhin wurden 8 ng aktiver Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA) zugesetzt, 15 Minuten bei 37°C und einem Endvolumen von 200 µl in An- und Abwesenheit von 20 mmol/l Arginin inkubiert, und die entstandene Plasminaktivität bestimmt, indem 50 µl 3 mmol/l HD-Val-Leu-Lys-pNA in 2 mol/l KCl zugesetzt wurden und die entstehende Absorptionsänderung/15 Minuten bei 405 nm doppelt ermittelt wurde.

Ergebnis

ohne Argininzusatz	mit Argininzusatz
delta A/15 Minuten	delta A/15 Minuten
a) 0,065	0,028
b) 0,038	0,026

Man erkennt, daß der erfindungsgemäße Hämostaseaktivierungs-Inhibitor die Fibrinolyseaktivierung durch lösliches Fibrin auf unter 50% des Ausgangswertes zu drücken vermag. Außerdem kommt es zu einer Neutralisierung des PAI-1 (Verhältnis b/a): ohne Arginin = 0,59; mit Arginin = 0,93), welchem pathogenetische Bedeutung bei der disseminierten intravasalen Gerinnung und/oder bei septikämischen Krankheitszuständen zukommt.

Beispiel 11

Spezifischer Nachweis von löslichem Fibrin in Gegenwart eines Hämostaseaktivierungs-Inhibitors

25 µl a) normales (Arginin/EDTA) Plasma, welches mit 34 µg/ml löslichem Fibrin (Kabi, Möldal, Schweden) supplementiert wurde, und

b) normales (Arginin/EDTA) Plasma, welches mit 1000 µg/ml BrCN-Fibrinogenspaltprodukten (Boehringer Mannheim, Deutschland) supplementiert wurde,

wurden inkubiert wie in folgender Aufstellung angegeben. Die zusammen mit dem t-PA-Substrat Plasminogen (oder alternativ dem t-PA) zugesetzte Konzentration an Arginin (oder Guanidinium) wurde variiert (13 bis 90 mmol/l Endkonzentration). Die erhaltenen Extinktionswerte für b) wurden durch die bei a) erhaltenen geteilt.

25 µl Plasma (120 mmol/l Arginin, 7 mmol/l EDTA)

+ 100 µl 9 CTA-Einheiten Lys-Plasminogen/ml in 100 mmol/l Tris, 0,05% Triton X 100®, 125 mmol/l Arginin, pH 8

+ 50 µl 12 mmol/l Chloramin T®

+ 50 µl 2,5 µg t-PA/ml in 30 mmol/l Natriumacetat, pH 4,2, 0,05% Triton 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur

+ 25 µl 3 mmol/l HD-Val-Leu-Lys-pNA in 3,6 mol/l KCl delta A/min bei 405 nm ablesen

Bestimmungen bei 0 mmol/l Arginin (Endkonz.) erfolgten ohne Zusatz von Arginin in Plasma und Test. Zur Nullwertkontrolle wird dem Plasminogen-Reagenz 10 mmol/l Tranexamsäure (Aminomethylcyclohexansäure → Inhibition der t-PA Stimulation durch lösliches Fibrin) zugesetzt. Der erhaltene Wert wird vom Hauptwert abgezogen.

Ergebnis:

70 mmol/l (Endkonz.) Arginin

a) delta A/min = 0,053

b) delta A/min = 0,0036

Arginin [mmol/l Endkonz.]	Quotient a)/b)	t-PA-Aktivität [%]
0	0,6	100
13	0,9	96
20	1,4	84
40	3,7	69
60	7,3	54
70	14,7	37
80	35,2	28
90	102,8	19

Ein hoher Quotient zeigt hohe Spezifität für Fibrin an, ein tiefer Wert zeigt an, daß der Test nicht zwischen Fibrin und Fibrinogenspaltprodukten diskriminiert. Je höher die zugesetzte Argininkonzentration, desto spezifischer wird Fibrin nachgewiesen. Die t-PA-Stimulation durch Fibrinogenspaltprodukte wird durch Arginin unterdrückt. So kann zwischen Thrombin- und Plasmin-Wirkung auf Blut unterschieden werden. Kovalent vernetztes Fibrin wird vom Hämostaseaktivierungs-Inhibitor nicht entpolymerisiert, im Gegensatz zu polymerisiertem Fragment X. Arginin oder Guanidinium inhibiert allerdings auch die Plasminogen-Aktivierung des zugefügten t-PA. Deswegen ergibt sich beim enzymatischen Test ein Optimum an Arginin zwischen 50 und 100 mmol/l Endkonz. Lösliches Fibrin oder polymerisiertes Fragment X kann auch über Antikörper nachgewiesen werden. Das erfindungsgemäße Agens würde die Antikörperspezifität beträchtlich erhöhen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer mindestens eine Guanidinogruppe der Formel $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ oder eines Derivats davon enthaltenden Verbindung als Hämostaseaktivierungs-Inhibitor.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung Guanidinocarbonsäure oder Guanidin ist.

3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Guanidinocarbonsäure Guanidinoessigsäure und das Guanidin Guanidiniumcarbonat ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Guanidinoessigsäure vorzugsweise mit Glycin oder Natriumhydrogencarbonat auf pH 7 bis 11, vorzugsweise pH 8 bis 10, gepuffert ist.

5. Verfahren zum Hemmen der Hämostaseaktivierung in Blut oder anderen biologischen Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß ein Hämostaseaktivierungs-Inhibitor nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Mengen zu Blut oder Plasma zugegeben wird, daß Konzentrationen im Bereich von 1 bis 200 mmol/l erhalten werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in Mengen zugegeben wird, daß Konzentrationen im Bereich von 5 bis 150 mmol/l erhalten werden.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor in einer Menge vorgelegt wird, daß ein Mischungsverhältnis von 1 : 2 bis 1 : 20, vorzugsweise 1 : 5 bis 1 : 10, mit Blut eine Plasmakonzentration von 100 bis 136 mmol/l (bei einem Hämatokrit von 35 bis 55%) ergibt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor einen basischen pH-Wert, vorzugsweise pH 7,4 bis 9, besonders bevorzugt pH 8,5 bis 8,8, hat.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Ethylendiamintetraacetat (EDTA) eingesetzt wird.
10. Verwendung des durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9 behandelten Bluts oder Plasmas für die Diagnose oder für die Transfusion.
11. Verwendung nach Anspruch 10 für die Diagnose von Hämostaseaktivierung.
12. Verwendung eines Hämostaseaktivierungs-Inhibitors nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zum Behandeln von pathologischer Hämostaseaktivierung.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die pathologische Hämostaseaktivierung eine Verbrauchskoagulopathie oder eine disseminierte, intravasale Gerinnung ist.
14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Hämostaseaktivierungs-Inhibitor einen pH-Wert von 7,4 hat.